

FRACTIONATION OF HYALURONIC ACID

Patent number: JP1043502
Publication date: 1989-02-15
Inventor: OGAWA ZENJI; others: 04
Applicant: NIPPON KAYAKU CO LTD
Classification:
- international: C08B37/08
- european:
Application number: JP19870199087 19870811
Priority number(s):

Abstract of JP1043502

PURPOSE: To fractionate hyaluronic acid or a salt thereof in a small width of MW distribution and a desired size, by processing said acid or said salt into a conjugated cpd. with a cationic surface active agent and applying the cpd. to a molecular sieve.

CONSTITUTION: Hyaluronic acid or a salt thereof is processed into a conjugated cpd. with a cationic surface active agent. The cpd., dissolved in a water-soluble org. solvent, is fractionated by means of chromatography, and is subsequently dissociated to give a fractionated hyaluronic acid or salt thereof. The cpd. can be obtd. by adding dropwise a cationic surface active agent, e.g., cetyltrimethylammonium halide or cetylpyridinium halide, to an aq. soln. of hyaluronic acid or a salt thereof and mixing them. The chromatography is carried out using, for example, a gel filtration or gel permeation carrier having a desired fractionation MW range and having been washed with an org. solvent of the same kind as the one dissolving the composite. The dissociation of the conjugate is carried out by adding to the fractionated soln. an inorg. salt of an org. acid soluble in the org. solvent used for the fractionation (e.g., sodium acetate).

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-43502

⑬ Int.Cl.⁴

C 08 B 37/08

識別記号

庁内整理番号

Z-6779-4C

⑭ 公開 昭和64年(1989)2月15日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 ヒアルロン酸の分画法

⑯ 特 願 昭62-199087

⑰ 出 願 昭62(1987)8月11日

⑱ 発 明 者	小 川 善 司	埼玉県熊谷市本石2-62
⑱ 発 明 者	関 守	群馬県藤岡市立石1546-10
⑱ 発 明 者	茂 木 義 夫	群馬県高崎市岩鼻町239
⑱ 発 明 者	西 山 博 明	群馬県佐波郡玉村町南玉100-8
⑱ 発 明 者	井 上 佳 美	群馬県高崎市岩鼻町239
⑰ 出 願 人	日本化薬株式会社	東京都千代田区富士見1丁目11番2号
⑲ 代 理 人	弁理士 竹田 和彦	

明 細 書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸の分画法

2. 特許請求の範囲

(1) ヒアルロン酸またはその塩とカチオン界面活性剤との複合体とし、その複合体を水溶性有機溶剤に溶解した後、クロマトグラフィーにより分画し、次いで複合体を解離させ、分画されたヒアルロン酸またはその塩を得ることを特徴とするヒアルロン酸の分画法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は分子量分布が狭く任意の平均分子量に調製されたヒアルロン酸又はその塩を採取する方法に関する。

〔従来の技術〕

ヒアルロン酸は保湿性にすぐれ、化粧品や外用塗布剤に利用されている。また、医薬分野において白内障の手術時の眼球保持剤として利用

され、さらに関節炎・腎炎など応用が展開されている、従来、任意の平均分子量に調製する法として加熱、酸アルカリ処理、超音波処理、酵素処理等分解し、得られたヒアルロン酸またはその塩を、水に溶解して分子篩過により分画する方法などが知られている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

サイエンス (Science) 228, 4705, 1324~1328 (1985)においてヒアルロン酸の分解物のうち、二糖類が4~5個連結したヒアルロン酸塩フラグメントである分画において脈管形成反応の誘発が認められるが、元の高分子量のヒアルロン酸塩や徹底的に分解したものには脈管形成能は認められないことが記載されておりある特定の分子量範囲を有するヒアルロン酸が特定の用途及び効果を有することが示唆されている。

しかしながらヒアルロン酸又はその塩の水溶液を限外篩過やゲル篩過、ゲル浸透等のクロマトグラフィーではヒアルロン酸のもつ特異性つ

まり巨大なランダムコイルを形成しその水和比容積は $2 \sim 10^3$ ml/g にもなる為分子量大分画する為には稀薄溶液の状態でないといけないので工業的でない。

〔問題点を解決する為の手段〕

本発明者らは効率よくヒアルロン酸またはその塩を分画できる方法を鋭意検討の結果本発明を完成した。

本発明はヒアルロン酸またはその塩をカチオン界面活性剤との複合体とし、その複合体を水溶性有機溶剤に溶解した後、クロマトグラフィーより分画し、次いで複合体を解離させ、分画されたヒアルロン酸またはその塩を得ることを特徴とするヒアルロン酸またはその塩の製造法に関するものである。

以下本発明について具体的に説明する。

ヒアルロン酸またはその塩とカチオン界面活性剤との複合体はヒアルロン酸又はその塩の水溶液にカチオン界面活性剤、例えばセチルトリメチルアンモニウムハライド（例えばクロライ

- 3 -

ド又はブロマイド）、セチルピリジニウムハライド（例えばクロライド又はブロマイド）を滴下混和することにより得ることができる。複合体は水不溶性となり沈殿するので、逕過または遠心分離により単離することができる。得られた複合体に水溶性有機溶媒（好ましくは水100gに50g以上溶解するもので、更に好ましくは水と無制限に混和するもの）例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール等の低級アルコール、変性アルコールまたはアセトンなどの低級アルキルケトン等を加えて溶解する。

この場合の複合体の濃度は分画するヒアルロン酸もしくはその塩の分子量にもよるが0.01～5%（w/v）程度であり、高分子量の場合程溶液の粘性が増加するため低濃度となる。例えば数十万～百万程度の平均分子量のものを分画する場合には0.1～2%程度が好ましい。平均分子量が100万～300万の場合には0.02～1%程度好ましくは0.02～0.5%程度である。

- 4 -

クロマトグラフィーには例えば複合体を溶解する有機溶剤と同じ種類の有機溶剤で洗浄した目的的分画分子量範囲をもつゲル逕過又はゲル浸透用担体例えばセファロースCL-6B、セファロースCL-4B、セファロースCL-2B、セファデックスG200等使用される。

クロマトグラフィーでの分画は、担体をカラムに充填し、有機溶剤に溶解した複合体溶液を静かにカラム上にのせ空間流速（SV）5以下好ましくはSV1以下でゲル中に浸透させ、同種類の有機溶剤でSV5以下好ましくはSV1以下で溶出する。溶出した液を一定量ずつ例えば使用した担体量の $\frac{1}{10}$ 液量ずつ分画する。また一般的なゲル逕過法例えば、バスケット遠心器、逕過筒等にて上記担体を充填して分画を行ってもよい。

分画した溶液に、分画に用いた有機溶媒に溶解する有機酸の無機塩、好ましくは低級脂肪酸のアルカリ金属塩例えば酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等を添加することにより、複合体は解離し、ヒアルロン酸ナトリウムやヒアルロン酸

ナトリウムなどのヒアルロン酸塩となって沈殿する。これを逕過または遠心分離で採取し、エタノールで洗浄した後乾燥すると所望の分子量に分画されたヒアルロン酸塩を得ることができる。またこの塩を常法により酸でフリーにすることによりヒアルロン酸とすることができる。

実施例1.

平均分子量の異なるヒアルロン酸ナトリウム3種（平均分子量26万、91万および130万）を15mgずつ計45mgを水10mlに溶解した。その1mlをとりその溶液の平均分子量を極限粘度より求める、残り9mlにセチルトリメチルアンモニウムクロライドを3%添加して複合体をつくりこれを遠心分離して、上澄液を捨てメタノール10mlでこの複合体を溶解する。予めメタノールで洗浄したセファロースCL-2B 200mlをガラスカラムに充填する。複合体のメタノール溶液を静かにセファロースCL-2B上にのせゲル内に浸透させ、続いてメタノールを空間流速（SV）0.5で通液する。通過液を40mlずつ

- 5 -

- 6 -

つ13分画した。各分画液に無水酢酸ナトリウムを0.1gずつ添加すると分画番号4, 5, 6, 12にヒアルロン酸ナトリウムが析出した。これをろ取し、エタノールで洗浄後乾燥し、0.2モル食塩水に溶解し、粘度、並びにカルバゾール硫酸法よりヒアルロン酸含量を求め、極限粘度を求め分子量を算出した。

結果 1.

	平均分子量
分画番号 4	132万
5	93万
6	56万
12	20万
原 液	55万

実施例 2.

実施例1と同様にサンプルを調製し、セファロースCL-6Bを使って分画を行った。

- 7 -

〔 効 果 〕

以上のようにヒアルロン酸またはその塩は水溶液の状態では分子ふるいによる分画でも分子量分画はできないが、カチオン界面活性剤と複合体とし有機溶媒のもとで分子ふるいにかければ分子量分画ができ、しかも分子量分布幅の小さい好みのサイズのヒアルロン酸またはその塩を取得できる。現在のところ真にヒアルロン酸を分子量分画した例はなく、この方法は工業的にも実施可能な方法である。

特許出願人 日本化薬株式会社

結果 2.

	平均分子量
分画番号 2	98万
3	58万
4	40万
5	29万
原 液	55万

比較例

実施例1で用いた平均分子量の異なるヒアルロン酸ナトリウム酸3種を15mg/mlずつ計45mgを水10mlに溶解した。1mlを原液サンプルとし残りの9mlをセファロースCL-2Bで分画したが分子量分画はできなかった。

結果 3.

	平均分子量
分画番号 6	50万
7	55万
8	55万
原 液	55万

- 8 -